

(19)日本国特許序 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平7-502723

第3部門第2区分

(43)公表日 平成7年(1995)3月23日

(31)Int.Cl.*
C 07 K 14/79
A 61 K 38/16
C 12 N 5/10

識別記号

序内整理番号
8318-4H

F I

8314-4C
9050-4B

A 61 K 37/14
C 12 N 15/00

ZNA A

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 15 頁) 最終頁に統く

(21)出願番号 特願平4-505865
(22)出願日 平成4年(1992)2月6日
(35)翻訳文提出日 平成5年(1993)8月6日
(86)国際出願番号 PCT/US92/00928
(87)国際公開番号 WO92/13550
(88)国際公開日 平成4年(1992)8月20日
(31)優先権主張番号 652,869
(32)優先日 1991年2月8日
(33)優先権主張国 米国(US)
(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE,
DK, ES, FR, GB, GR, IT, LU, MC, NL,
SE), CA, JP

(71)出願人 ザ・ユニバーシティ・オブ・バーモント・
アンド・スティート・アグリカルチュラル・
カレッジ

アメリカ合衆国バーモント州05405バーリ
ントン(番地なし)

(71)出願人 ユニバーシティ・オブ・ブリティッシュコ
ロンビア
カナダブリティッシュ・カナダブリューエル・ブ
リティッシュコロンビア・バンクーバー
(番地なし)

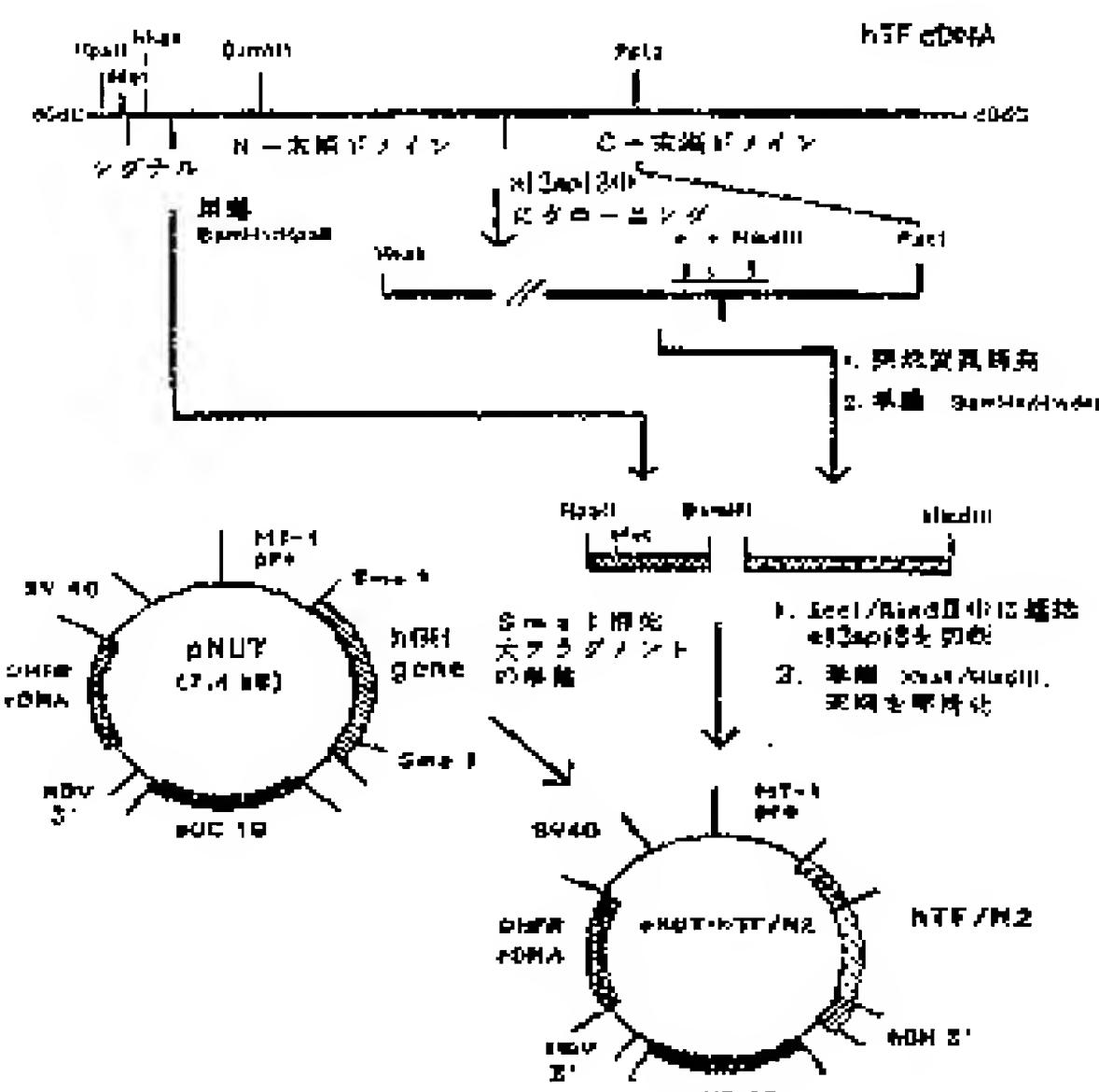
(74)代理人弁理士 小田島 平吉

最終頁に統く

(54)【発明の名称】組み替えトランスフェリン、トランスフェリン半分子、及びそれらの突然変異体

(57)【要約】

金属結合性が変えられた、又は他の性質を有する組み替えトランスフェリン、トランスフェリン半分子、及び突然変異体トランスフェリンにつき記載する。組み替えトランスフェリン分子は組み替え分子をコードする発現ベクターを用いて形質転換されたベビーハムスター腎臓細胞などの安定な真核細胞系により機能的形態で発現される。組み替えトランスフェリンは金属の過剰負荷に苦しむ患者において過剰の毒性金属を結合して除去する金属キレート化治療に用いることができる。



請求の範囲

1. 細み替えトランスフェリン。
2. 細み替えヒト血清トランスフェリン。
3. 少なくともトランスフェリンの1個の突出部の金属-結合ドメインを含む、トランスフェリンの細み替え半-分子。
4. 1個の突出部がヒト血清トランスフェリンのアミノ末端突出部である、請求の範囲3に記載のトランスフェリン半-分子。
5. 1個の突出部がヒト血清トランスフェリンのカルボキシ末端突出部である、請求の範囲3に記載のトランスフェリン半-分子。
6. 少なくともトランスフェリンの1個の突出部の金属-結合ドメインを含み、天然変異体の金属に対する結合力が天然のトランスフェリンより強い、天然変異体トランスフェリン半-分子。
7. 鋼に対する結合力が天然のトランスフェリンより強い、請求の範囲6に記載の天然変異体トランスフェリン半-分子。
8. 少なくともトランスフェリンの1個の突出部の金属-結合ドメインを含み、天然のトランスフェリンの位置206のリシン残基がグルタミンにより置換されている、請求の範囲7に記載の天然変異体トランスフェリン半-分子。
9. トランスフェリン、又は少なくともトランスフェリンの1個の突出部の結合ドメインを含むトランスフェリン半-分子をコードする核酸を、腫瘍細胞中の発現に適した連続的調節野と結合させて含む核酸導体を含む、真核生物ベクター。
10. 核酸導体がトランスフェリン又はトランスフェリン半-分子をコードする核酸に結合したトランスフェリンシグナル配列をコードする

核酸を含む、請求の範囲3に記載の異性発現ベクター。

11. 1個の突出部がヒト血清トランスフェリンのアミノ末端突出部である、請求の範囲1りに記載の異性発現ベクター。
12. 1個の突出部がヒト血清トランスフェリンのカルボキシ末端突出部である、請求の範囲1りに記載の異性発現ベクター。
13. トランスフェリン半-分子が天然のトランスフェリンのリシン残基の代わりに位置206にグルタミン残基を含む、請求の範囲9に記載の異性発現ベクター。
14. 請求の範囲9に記載のベクターを用いてトランスクレプションされた真核細胞系。
15. 請求の範囲9に記載のベクターを用いてトランスクレプションされたベビーハムスター腫瘍細胞系。
16. 少なくともトランスフェリンの1個の突出部の金属-結合ドメインを含むトランスフェリンの細み替え半-分子を、金属の漏出量を下げるのに十分な量で患者に投与することを含む、金属キャリート化治療の方法。
17. 金鋼が該である、請求の範囲13に記載の方法。
18. トランスフェリン半-分子が天然のトランスフェリンより激しく鉄と結合する天然変異体である、請求の範囲17に記載の方法。
19. トランスフェリン半-分子が天然のトランスフェリンのリシン残基の代わりに位置206にグルタミン残基を含む、請求の範囲13に記載の方法。
20. 細み替えトランスフェリンを含む細胞培養培地のための非血清液体。

明　　細　　章

細み替えトランスフェリン、トランスフェリン半-分子、及びそれらの天然変異体

発明の背景

集合的にトランスフェリン又はシテロフィリンを含むる鉄-結合ブロードスペクチンは、著しく弱いの構造を有するタンパク質の積層を含む。ヒドロクトフェリン (Anderson, B. F. et al., (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84: 1769-1773) 及びウサギ血清トランスフェリン (Bellamy, S. et al., (1988) *Biochemistry* 27: 5804-5812) のX-線結晶学的分析は、これらのタンパク質が複数ペプチドにより連結された2種の類似した突出部を含み、各突出部は金属イオン及びカチオニンのための結合部位を含む共に親水性を有する2箇のドメインを含むことを明らかにしている。

ニワトリオボトランスフェリン遺伝子が形質転換マウス中で発現され (McKnight, G. S. et al., (1983) *Cold Spring Harbor Laboratory, MA* 34: 335-341)、ラットトランスフェリンの一部とガラクトシダーゼの融合タンパク質がE. coli L-1中で発現された (Aldred, A. et al., (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 122: 960-965)。この融合タンパク質を除き、同様にトランスフェリン又は分子の一部を発現する試みは不成功であった (Aldred, A. et al.,

(1984) *Biochemistry*, 23: 2001-2006; (1985) *Science*, 232: 960-965)。おそらくタンパク質の高度に回旋状の構造及び分子内の多數のリスルフィド架橋がバクテリア宿主中の表現に対する主要な障壁であろう。アルカリホスファターゼシグナル配列を付けてタンパク質をバクテリア膜脂質に局在化することにより、天然のタンパク質の折り畳み構造を部分的に最小にする試みは不成功であった。

発明の課題

本発明は細み替えトランスフェリン、少なくともトランスフェリンの1個の突出部 (アミノ-末端又はカルボキシ-末端) の金属-結合ドメインを含む細み替えトランスフェリン半-分子、及びトランスフェリンの発現のための安定な細胞培養系に関する。細み替えトランスフェリンは安定な形質転換された真核細胞、例えばベビーハムスター腫瘍細胞中で発現して生-又は半-分子の形態の基本的に均一な (準分散) 飲料を与えることができる。本発明は又、天然 (野鳥-型) の形態のトランスフェリンと異なる金属-結合性又は他の性質を有する天然変異体トランスフェリン及びトランスフェリン半-分子に関する。これらには既又は他の金属への結合が天然のトランスフェリンより激しいかあるいは穢れがある天然変異体トランスフェリン及びトランスフェリン半-分子が含まれる。

トランスフェリン半-分子は金属漏出異常症又は金属中毒にかかる患者の処置のための金属キャリート化治療に使用することができる。例えばトランスフェリン半-分子、特に天然のトランスフェリンより激しく鉄と結合する天然変異体をサラセニアなどの鉄-過剰負荷患者に投与し、その体から過剰の毒性の鉄を除去することができる。さらに半-分子又

は金属イオン選択性が変わらぬたその突然変異体を用いて他の酵素金属、銅、鉄、水酸化物、カドミウム、镉又は重鉛を体から除去することができる。

図の説明

図1はhTf/2NにおけるhTf/2N転写ベクターの構造を示す。ヒト血清トランスフェリンをコードする2,3-セミのcDNAをヒト肝臓cDNAライブラリから単離し、完全アミノ酸配列ドメインコード配列を含む1,5ヘクタードル/ヘクタードルを約1.3mole/g中にクローニングする。二重翻訳停止コドン及びHindIII認識配列を特定部位の突然変異誘発により導入し、BamHI/HindIII+1フラグメントの導入を可能にし、それがBamHI/HpaIIフラグメントと結合するアミノ酸配列ドメイン及びシグナル配列をコードした。このフラグメントを直接転写ベクターのNUT中にクローニングし、ベクター-hTf/2N/hTf/2Nを得た。このプラスミドにおいてトランスフェリンcDNAはヘクタードルシグナルを用いて頭部のHATR-cDNA(DNAアミノ酸DNA)の発現を促進するSV40初期プロモーター(SV40)を含む。

図2は、種々のペビーハムスター腎臓細胞系からの免疫沈降物のウエスタンブロットを示す。2H₂O-硫酸細胞培養物からの細胞ライソーム(a)及び培地(b)の試料を抗-hTf抗血清を用いて沈降させた。前駆体したペレットの試料をNaDODS-PAGEにより分析し、エトロセルマースに移し、抗-hTf抗血清及びその後アルカリホスファ

ターゼ複合抗-hTfGを用いて染色させた。hTf-hTfNUT及びhTf/N2-hTfNUT細胞を50.0μg/mlのMITSU中で培養し、DMEM/10%ケンタッキーベルバート血清中ですべての細胞を培養した。1列、BHK細胞；2列、hTf-hTfNUTトランスフェクションBHK細胞；3列、hTf/N2-hTfNUTトランスフェクションBHK細胞。分子量マーク(x10³)の位置をプロットの右に示し、追加のM, 3.7, 0.00のタンパク質バンドの位置もプロットの右に示す(<37)。

図3はhTf/2Nの溶解及びPAGE分離を示す。(パネルA)粗み替え-hTf/2N(上段)及びタンパク質分解酵素hTf/2N(下段)のPolyanion-SIのカラム上におけるAPLC結果。(パネルB)分子量標準(Mr)及びパネルAからのピークa~dの各3ugのNaDODS-PAGE(アクリルアミドの5-12%勾配)。(パネルC)APLCピークa-d(粗み替え-hTf/2N)及びパネルAからのピークe-h(タンパク質分解酵素hTf/2N)の許可溶液条件下におけるケラート-PAGE。アボートタンパク質(EPO)及び核-結合タンパク質(F)の位置を示す。EPOで用いられた条件は材料及び方法にて示す。PELC部分は以下のように集めた：ピークa(電気23-27)、ピークb(28-31)、ピークc(32-35)、ピークd(39-45)、ピークe(28-31)、ピークf(32-36)、ピークg(38-44)及びピークh(46-51)。

図4は1.0mMのFe(III)(NTA)₃を用いた主要形態の粗み替え-hTf/2Nの測定を示す。タンパク質の量は上、0.0mLの1.0mM-NaHCO₃中の3,684Azs単位であった。脱氷凍解容器に試料をそれぞれ加えた後5~10分間観察スペクトルを測定した。

図5は粗み替え-hTf/2Nの核磁気共鳴スペクトルを示す。(a)2H₂Oのラインプロードニングを用いたフーリエ変換スペクトル。(b)4H₂Oのラインプロードニング及びDC=4.0, NS=68800における回転差スペクトル(convolution difference spectrum)。タンパク質試料はH₂O中の0, 1M-KCl, 0, 1mL中で溶解であった。

図6はm-HD-Tyr粗み替え-hTf/2Nの¹³C核磁気共鳴スペクトルを示す。図は1.0H₂Oのラインプロードニング、NS=3,000を用いたフーリエ変換を示す。タンパク質試料はH₂O中の0, 1M-KCl, 0, 1mL中で6mLであり、(許可はH₂O中の0, 1Mの三フッ化酢酸)であった。

図7はhTf/2Cコード配列の創造のためにPCRプライマーとして用いた2つの別々のオリゴヌクレオチドを示す。カルボキシ末端のためのコード配列を含むH₂O上記フラグメントを、25ngのPCR増幅の終点として用いた。オリゴヌクレオチド1はGma(脱離活性)及び天然のhTfシグナル配列を含む5'末端に含み、その3'末端でhTfのアミノ酸834~841のコード配列を含む。オリゴヌクレオチド2はhTf-cDNAの3'末端領域の配列を含む。この部位に既存のカルボキシ末端配列を導入する。

発明の詳細な説明

本発明は粗み替えトランスフェリン、粗み替えトランスフェリン等一分子、及び天然のトランスフェリン分子を比較して金属-結合能の同士など、性質が変化したヒトトランスフェリン及びトランスフェリン半一分子の突然変異体を与える。粗み替えトランスフェリンは大量に、及

び実質的に等量の〈準分散〉形態で製造することができる。例えばヒト血清トランスフェリンの粗み替え等一分子は、他のヒト血清タンパク質を実質的に含まない基本的に等量の試料として製造することができる。対照的にカロータンパク質のタンパク質分解により製造された等一分子は複数が困難で、実際にヒトトランスフェリンのカルボキシ末端半分をタンパク質分解の手段により補足に製造することはできない。粗み替え法は、トランスフェリンの新規形態の設計及び製造に突然変異誘発を適用することも可能にする。

一般に本発明の粗み替えトランスフェリンは、トランスフェリンをコードする核膜構造物を用いて画した宿主細胞をトランスフェクションし、トランスフェクション宿主細胞を表現に適した条件下で培養し、細胞により発現された粗み替えトランスフェリンを回収することにより製造される。各種類のトランスフェリンのアミノ酸配列が報告された(J. L. Lescot, J. -M. and Chambon, P. (1982) *Eur. J. Biochem.* 122: 291-295; MacGillivray, R. T. A. *et al.* (1983) *J. Biol. Chem.* 258: 3543-3553; Metz-Boutigue, M. -M. *et al.* (1984) *Eur. J. Biochem.* 145: 659-676; Rose, T. M. *et al.* (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 1261-1265; Baldwin, G. S. and Weinblat, J. (1988) *Nucleic Acids Res.* 16: 8720-8730)。ヒト血清トランスフェリンのcDNA配列が決定された(Yanagisawa, P. *et al.* (1984) *Proc. Natl. Acad. S*

c.i., U.S.A. 登録: 2752-2756)。組み替えたransフェリソの製造のための全長DNA又はtransフェリソあるいはその一部のアミノ末端又はカルボキシ末端突出部のいずれかをコードする切断DNAを、利用できる供給源から得ることができるか、又は構造的方法により既知の順序に従って合成することができる。組み替えたransフェリソを細胞培地中に分泌させるために、transフェリソシグナル配列(又は発現系に適した他のシグナル配列)をコードするDNAをtransフェリソコードDNAの上部に置く。

transフェリソ及びトリニティエリン半分子の突然変異株を、物質活性の突然変異検査の標準的方法により検査することができる。Taylor et al. (1985) *Nucleic Acids Res.* 13, 8749-8764; Zolotar, M. I. and Smits, M. (1988) *Meth. Enzymol.* 100: 456-500を参照。特に突然変異検査を用いて天然のtransフェリソと異なる金属結合性を有する突然変異株transフェリソを製造することができる。例えば、天然のtransフェリソより強く鉄と結合することができる突然変異株を製造することができる。そのような突然変異株の製造のためには、企図一端合ドメインの突然変異を誘発し、結合に含まれる1個又はそれ以上のアミノ酸を別のアミノ酸と置換することができる突然変異株を製造することができる。そのような突然変異株の企図には、企図一端合ドメインの突然変異を誘発し、結合に含まれる1個又はそれ以上のアミノ酸を別のアミノ酸と置換する。ヒト癌細胞transフェリソの場合の企圖キレート化のためのリガンドであるアミノ酸を下記に示す(アミノ酸の番号は一次配列中のアミノ酸残基の位置を示し、その場合成熟タンパク質の第1ペプチドを位置1と決定する)。

アミノ末端側山野

カルボキシ末端突出部

他の酵素をコードする。これにより、transフェクションされた細胞を非常に高濃度(0.5 mM)のメトキシセトート中で直接選択することが可能になり、ジヒドロホシートレダクターゼの不足した先天性酵素の必要性を遮する。pNUTではpUC18導導配列も含み、それによりpNUTがE. coli中で増殖されて受容性相違のtransフェクションのために十分な量のプラスミドを与えることができる。

transフェリソをコードするDNAを含む発現ベクターは、適した宿主細胞中に挿入される。好ましい宿主細胞は、ベクターを用いて形質転換され、機能的に活性のtransフェリソ複合物を発現する安定な細胞系を与えることができる実験細胞である。特に有用な細胞はベビーハムスター腎臓細胞である。ベビーハムスター腎臓細胞は、transフェリソをコードするDNA複合物を有するベクター(例えばpNUTなど)を用いてtransフェクションされ、機能的に活性なtransフェリソ(全又は半分子)を表現し、分泌する安定な細胞培養系を与えることができる。これらの細胞は経済的な大规模応用に十分適しており、容易に利用できる供給源から得ることができる。

リソカルシウム共に又はエレクトロポレーションなどの標準的方法を用い、真核細胞をベクターでtransフェクションすることができる。その細胞を、transフェリソの発現を標準するのに適した条件で培養する。例えばpNUTベクターを用いてtransフェクションしたベビーハムスター腎臓細胞を、重金属の存在下で剥離し、transフェリソ複合物を発現させることができる。ベビーハムスター腎臓細胞は、崩壊抑制剤(trasferin-GM600)を約1%で含む

り

の成形培地(Transferring Ham's F-12栄養剤

(アミノ酸1-927)		(アミノ酸43-679)	
アスパラギン酸	6.8	アスパラギン酸	0.92
チロシン	9.5	チロシン	4.26
フェニルアラジン	18.8	フェニルアラジン	5.19
ヒスチジン	24.9	ヒスチジン	5.84

他の類似のtransフェリソの場合、番号が異なりリガンド(アミノ酸)は同一である。

transフェリソの他の領域は結合を妨害し、これらも突然変異説明の機能となることができる。通常これらは既に導入したアミノ酸、例えばリシン、ヒスチジン又はアルギニンである。例えば天然のtransフェリソより強く鉄と結合する突然変異株transフェリソ半分子は、206位のリシン残基をグルタミンで置換することにより(AAG→CAG)酸化することができる。

transフェリソコードDNAを、DNaseの発現を指示するための適した調節要素を含む真核発現ベクター中にクローニングすることができる。好ましい真核発現ベクターはPMT1として、R. D. Smith (1987) *Cell* 50: 405-410により記載されたプラスミドpNUTである。このプラスミドはクレオチオキシンプロモーターを含み、それは重金属及びヒト成長ホルモンの軽写停止シグナルの存在下におけるtransフェリソコードDNAの転写物を含む。さらにpNUTは、粗細胞培養中における選択を可能にするためのヒト型肝炎ウイルスからの軽写停止シグナルと共にSV40初期プロモーターの制御下にあるジヒドロホシートレダクターゼ遺伝子を含む。遺伝子は、競争的阻害剤メトトレキサートに対する強和力が270倍高い突然変異

複合物の培地中で培養するのが好ましい。

適した培養期間の後、遊離され、分泌されたtransフェリソを培地中で回収することができる。標準的精製法を用いて組み替えたtransフェリソの実験的等電点の試料を得ることができる。1つの具体化の場合、培地中のtransフェリソに鉄を飽和させ、その後アニオン交換クロマトグラフィーにより精製する。

本発明の組み替えたtransフェリソは、鉄又は他の陽性金属とキレート化し、体から除去するのに用いることができる。生体内の鉄キレート化の適切な方法は、微生物起源の天然に存在する多様なシクロフォア及び合成鉄キレート剤を、その生物学的效果、主に鉄と結合して体から除去する能力によって評価することであった。このような化合物の多くが研究され、鉄の除去の能力は様々であり、多くの場合許容しえない副作用があった(P. J. C. G. et al. (1978) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 208: 12-18)。その結果、ヒトから過剰の鉄を除去するために用いられるキレート剤として、ストレブトミセス・ビロシス(*Streptomyces pilosus*)からの酵母ペプチドであるデフュロキサンのみが残っている。

鉄キレート化結核に詳ましいtransフェリソは、天然のtransフェリソより強く鉄と結合する突然変異株transフェリソ半分子である。突然変異株半分子の初回により、金属のより有効なキレート化及び除去が可能になる。特に好ましい突然変異株半分子は、下記の実験的に記載するK206Gであり、これは206位リシンではなくグルタミンを含む。transフェリソ半分子は、ホロタンパク質を表すより開拓の新規体を通過し、膜中に捕捉され、從って金属がキレート化さ

特表平7-502723 (5)

れるのみでなく体から除去されるので有利である。さらに臓器の半分子は核糖細胞の膜上のトランスフェリンレセプターと結合しないので、これらの粗粒に結合を構造しない。さらにヒトトランスフェリンの半分子はおそらくヒトの体により“自己”と認識され、從って免疫学的応答を引き出さない。

さらに突然変異体半分子は、金剛イオン選択性が異なるように設計することができる。キレート化剤を用いて他の毒性金属、例えば鉛、水銀、カドミウム、銅及び亜鉛を体から除去することができる。

キレート化治療の場合、金剛をキレート化して毒性を毒性濃度以下に下げるのに十分な量で組み替えたトランスフェリンを患者に投与する。一般にこれは生物学的に許容し得るビヒケル、例えば食塩水中で、希釈的濃度で(即認的)に筋筋肉内)投与する。

組み替えたヒトトランスフェリンは、細胞培養培養のための非血清細胞中で使用することができる。トランスフェリンは成長細胞による転写段階に必要である。組み替えたトランスフェリンの使用により、ヒト細胞から精製したトランスフェリンに伴う汚染物(例えばHIV又は肝炎ウイルス)の危険を避けることができる。

本発明を以下の実施例によりさらに例示する。

実施例

1. アミノ末端突出部を含む組み替えたトランスフェリン半分子の製造

材料

T4-DNAリガーゼ、DNAポリメラーゼI(タレノウフラグメント)及びT4ポリスクレオチドキナーゼは、Pharmacia-PL

Biochemicalsから購入した。試験ニンドスクレアーゼはPharmacia PL Biochemicals及びBecton Dickinson Research Laboratoriesから購入した。オリゴヌクレオチドは、Applied Biosystems 0.80 A cDNA合成機上で合成した。エトロセルロースフィルターは、Schleicher and Schuellから、³³P-標識スクレオチドはNew England Nuclearから、ヒツジ抗ヒトトランスフェリン抗体はSigma Chemical Companyから、ホルマリナー固定スクリューバックス(アウレウス(S. saprophyticus aureus))細胞は、Becton Dickinson Research Laboratoriesから、プロトプロット(Proteoblot)免疫スクリーニング検出薬はAmershamから、オリゴスクレオチド指示(Oligonucleotide Labeling-ndirect)突然変異検査キットはAmershamから、Dulbeccoの修正必須培地及びウシ胎児血清はGibcoから、及び統一ヒトトランスフェリンモノクローナル抗体HTF-14はCzechoslovakian Academy of Sciencesから貰た。他の試薬はすべて分析用か又はそれ以上の純度であった。

方法

ヒト胎児トランスフェリン(hTf)-cDNAの単離: Dr. Steven Orkin (Harvard University) 提供による *E. coli* 製造ベクター-pKT-218 (Promega UK, E. V. et al. (1983) *J. Biol. Chem.* 2

58: 8389-8394) 中に精製されたヒト胎児-cDNAライブリアーを、血清ヒトTfのアミノ末端8アミノ酸をコードする合成オリゴスクレオチドをハイブリッド形成プローブとして用いてスクリーニングした。オリゴスクレオチドはYang, F. et al. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 2752-2756により報告されたhTf-cDNA配列のヌクレオチド88-111に対応した。オリゴスクレオチドはT4ポリアクレオチドキナーゼ及び³²P-ATPを用いて末端-標識し (Chaconas, G. and van de Sande, J. H. (1980) *Methods Enzymol.* 65: 76-85)、約10¹⁰個のコロニーのスクリーニングに用いた。導性のクローンの制限エンドオブリオーゼマッピング及びSDS-PAGE分析を、それぞれUC19及びM13ムーロベクターを用いて標準的方法で行った (Maniatis, T. et al. (1982) *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY; Messing, J. (1983) *Methods Enzymol.* 101: 20-78; Sanger, F. et al. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467)。

発現ベクター及び細胞培養: 製造ベクター-pNUT (Patinier, R. D. et al. (1987) *Cell* 50: 435-443) 及びベビーハムスター腎臓(BHK)細胞はDr. Richard D. Patinier (Howe

rd Hughes Medical Institute, University of Washington) の提供による。合成後、オリゴスクレオチドをC₁₈逆相カラム上で精製した (Sep-Pak Waters Associates; Atkinson, T. and Smith, M. (1984) *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach* (Gait, M. J., Ed.) pp 86-81, IRL Press, Oxford). Taylor, J. W. et al. (1985) *Nucleic Acids Res.* 13: 8749-8764の方法を用いることにより、特定位盤の突然変異検査を行った。プラスミドDNAは、*E. coli* JM109から精製し、塩化セシウム密度勾配を用いた2重螺旋法により生成した。

BHK細胞を、10%のウシ胎児血清を含むDulbeccoの改良必須培地(DMEM) 中で10-cmの皿当たり約10³細胞で成長させ、既にSearie, P. F. et al. (1985) *Mol. Cell. Biol.* 5: 1480-1489に記載のリン酸カルシウム法により10μLのプラスミドを用いてトランスフェクションした。24時間後、培地を100μMのメトトレキセート(MTX) を含むDMEMに変え、生存細胞を500μMまで濃度で顕微鏡にて観察した。いくつかの実験では300μMのMTXを直接用いて細胞を殺却した。大規模の回転板培養は、10.0mlのDMEM-MTXを含むそれぞれ8.0cm²の回転板中に約5×10⁴個の細胞を播種して開始した。ZnSO₄を0.08mMの最終濃度まで培地に加えることにより80%の密度にて培養物を増殖した。培地を40時間後には換液した。

特表平7-502723 (6)

免疫沈降及シクロストーンプロッティング 培養培地及び相
互ライカートの免疫沈降を、Van Oost, B. A. et al.
(1986) *Biochem. Cell Biol.* 64: 690-7
01の方法により行った。沈降物をNaDODSの保存下における
12%アクリルアミドゲル上の電気泳動により分析し (Shatton,
J. W. K. (1970) *Marker* (London) 227: 6
80-685)、その後ニトロセルロース膜上にプロッティングした。
プロットをり、1 mg/mlのセラチンを含むPBS中でインキュベー
トし、その後ヒツジ抗-ヒトIgG抗体 (PBL中に250-IgG) を
用いて処理し、最後にアルカリキスファターゼ複合ウサギ抗-ヒツジ
IgG抗体を用い、供給者の指示に従って発色した。

アミノ酸配列 3-アラニドキロシンを組み替えてTF/ZN中に
1-F-NMRプローブとして挿入するため、培養培地に等量の1%
のレチロン濃度で、L-の-アラニドキロシン (Sigma-C
hemical Company) を補足した。細胞はD-レチロ-
ルオキシドのない培地と同様にこの培地上でも十分に成長した。

組み替えたTF/ZNの単離 収穫した培養培地をフェニルメチル
スルホニルフルオリド中で0.01%としてプロテアーゼを阻害し、培
地中のトランスクエリンのすべてを脱酸させるために十分なFe (III)
(NTA) を加えた。密閉で振拌した後、溶液を冷却過剤水に対して
24時間、その後3:1:1-Q精製水に対して数回透析した。凍ト
リス-HCl緩衝液、pH 8.4を5 mMの最終濃度まで加え、試料を
透心して破片を除出し、10 mMのトリス-HCl緩衝液、pH 8.4
で平衡化したひだE-Sephadex (Pharmacia) のカ

ラム (2.5 × 80 cm) に負荷した。

その後カラムを同緩衝液中のNaClの濃度勾配 (0~0.3 M) を
用いて溶離した。ピンク色を示す部分をNaDODS-PAGEにより
分離し、組み替えたタンパク質 (Mr 37,000) を含む部分を集め
た。そのような部分は、相應培養培地中のウシ胎児組織からのラン
クランスクエリン及びアルブミンを含む。集めた部分をAmicon-P
M-10膜上で5 mlに濃縮した後、タンパク質を、1.0 mMの硫酸
水素アンモニウムで平衡化したSephadex G-75 Super
fine (Pharmacia-Peptide Biochemicals) のカラム (2.5 × 90 cm) 上のクロマトグラフィーにかけた。

ウシタンパク質から得たTF/ZNを完全に分離するためには、このカラ
ムを通して2回目のクロマトグラフィー段階が必要な場合がある。この
段階で145/144時間弱く3.0であり、冷蔵ヘムートンタンパク質 (お
そらくヘモペチシン) の存在を示している。HTF/ZNは、5.0 mM
のトリス-HCl、pH 8.0中のNaClの濃度勾配 (0~0.3 M)
を用いたPolystyrene S-1 (Pharmacia) のカラム (1
× 10 cm) 上で1 ml/分の流速にて1時間かけたPBE-1Cにより最
終的に精製して保管した。上の部分を擇めた。タンパク質の恢
復率は約2-4倍のタンパク質バンドがカラムから見れた。

5%~12%ゲル配列を用いてNaDODS-PAGEを行い、
McKey, D. G. and Seal, U. S. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 452: 250-256の方
法の修正 (Brown-Mason, A. and Woodward,
R. C. (1984) *J. Biol. Chem.* 259: 1866-1

を73) に従ってウレア-PAGEを行った。3.10 mlのガラスカラ
ム (LRB) 中の0~50%スコース勾配上で0.5%のPharm
acia, pH 5.8 (Pharmacia) を用いて蛋白質電気泳動
を行った。カラムは1000 Vにて2 mlの最終電流にて予選挙中を
使った。

0.2 ml中の試料を勾配の半ばから回収したものの溶媒で希釈し
た。その後試料をカラムの等高濃度域に再注入し、差動を24時間施け
た。初期をカラムの底から1.5 mlの部分で擇めた。各部分を5 ml
及びpHに関して分析した。最高Abs₂₈₀を有する部分を、アボート及び
一輪和タンパク質のpHを求めて選択した。

次は、1 mMのNTA、1 mMのEDTA、0.5 mMの酢酸ナトリウ
ムを含む緩衝液、pH 8.0、其中でインキュベートすることにより、ホ
タクタンパク質から容易に除去できた。アボートタンパク質をCentrifuge
on 10 (Amicon) 上で最小体積に濃縮し、その液体を用いて
2回、及び0.1 MのKClを混じて2回洗浄して再濃縮した。アボ
ートタンパク質は純水中で沈殿する傾向があるが、0.1 MのKCl中に容
易に溶解解した。アボートタンパク質をNaHCO₃中で1.0 mMとし、
4.65 mlにて吸収を監視しながら適した濃度のFe (NTA) を調定
した。

組み替えたTF/ZNの定量的免疫検定 独特的親相免疫検定を用
い、精製の種々の段階で培養成中の組み替えたTF/ZNの濃度を評価
した (Foster, W. B. et al. (1982) *J. Cell. Physiol.*
28: 649-661)。タンパク質分解-測定Fe-HTF
/ZN (Lineback-Zins, J. and Brew, K. C.)

980) *J. Biol. Chem.* 255: 708-713) をIod
ogen (Pierce Chemical Company) を用いて放射ヨウ素化し (Fraker, P. J. and Speck, J.
C., Jr. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80: 848-857)、標識として用いた。モノクロ
ーテル抗-ホトTF抗体であるHTF-14をプローブとして用いた (B
artlak, J. et al. (1984) *Folia Biol. (Pra
eque)* 30: 137-140)。この抗体はホトTFのアミノ末端
側面部のみを認識し (Mason, A. B. et al. (1988)
Br. J. Haematol. 65: 392-393) ウシトランスク
エリンを認識しない (Penefitlow, R. C. et al. (19
88) *J. Cell. Physiol.* 128: 251-260)。

アミノ酸配列分析 組み替えたTF/ZNの外在表面及び生
物活性側面のアミノ酸配列をUniversity of Ver
montのGiven Analytical Facilityにて
Applied Biosystems 470A Protein
Sequencer上にて決定した。

過ヨード酸脱色-シッキ色 組み替えたTF/ZN中のオリゴ糖の存
在を、タンパク質を過ヨード酸脱色-シッキ試薬で染色することにより検定
した (Fairbanks, G. et al. (1971) *Biochem
istry* 10: 2605-2617)。

核磁共振スペクトル Camille and Henry Dr
eyfus NMR Laboratory, Department
of Chemistry, University of Vermon
t

atにおける5.872 Tera's Bruker WM-NMRスペクトロメーターにて、成績横出(quadrature detection)を用いたフーリエ変換モードで操作してプロトン及びフッ素NMRスペクトルを得た。¹³Fプローブはその専門のDr. Christopher W. Almondにより提供された。プロトンスペクトルの観察、スペクトロメーターの設定は前述の通りであった(Vale et al., A. A. and Woodward, R. C. (1987) *Dioscorea* 26: 3120-3125)。¹³Fスペクトルの観察、積算値は30,000Hzであり、アケイクション時間は0.229秒であり、アケイクションを1.5, 0.1s(90°)のパルスの間に2-4秒のレシーバーダレー(receiver delay)が介在し、試料は303°Cであった。¹³F化學シフトは¹Hの中のり14Mの系フッ化酢酸に対する。アンバク質試料は0.1mlのり、8原子%¹³C中の6-8ppmであり、スペクトルは¹³Cを含む標準物5mm-NMR管に挿入された0.1mlのカッセル中のこれららの試料につき観察した。¹³Fスペクトルの自由鍵導滅衰(free induction decay)につき、フーリエ変換の前に10回のタイミングコードニングを行った。

結果

ヒトTF-cDNAの単離。ハイブリッド形成プローブとしてヒトTF-cDNAの5'配列への24塩基オリゴヌクレオチドを用い、ヒト胚発育cDNAライブラリ(Preichowick, E. V. et al. (1983) *J. Biol. Chem.* 258: 8389-8394)の約100,000箇のコロニーをスクリーニングした。1箇の陽

性のコロニーを得た。このコロニーから単離されたプラスミドの広範囲(extensive)剝離酵素マッピングは、Yang, F. et al. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 2752-2756により同一のライブラリから単離されたヒトTF-cDNAから予想されたパターンと完全に一致した。このクローニングのS' -及び3' -末端のDNA配列分析は、それがYang, F. et al.により単離された全長クローニングと同一であることを確認した。このcDNAの突然変異説明及びサブクローニングの際に行われるその他の配列分析はすべて以前に報告された配列に正確に統一した。

ベクター構造及び発現。2倍の翻訳停止マトン及び子供のHind III認識部位をもつTF-cDNA配列のアミノ及びカルボキシ末端ドメインの頭のリンクー領域に、オリゴヌクレオチド指示突然変異説明により導入した。この構造物からの既定翻訳配列は、頭部TFを含む付け配列に従いAATT→3'で終わる(MacGillivray, R. T. A. et al. (1983) *J. Biol. Chem.* 258: 3543-3553)。

発現ベクターpNUT(Palmiter, R. D. et al. (1987) *Cell* (Cambridge, MA) 50: 435-443)はマウスマタロチオヌクレイン-1ノント成長ホルモン遺伝子融合物を含み、これは形質転換マウスにおいて多量のヒト成長ホルモンを発表することが示された(Palmiter, R. D. et al. (1983) *Science* (Washington, D. C.) 222: 809-814)。このベクターの重要な遺伝的特徴には、マウスマタロチオヌクレイン-1プロモーターに重金属の存在下でのDNA転写を誘導させ、E-

co.上中でよりC18優勢の複製及び選択を可能にし、より多くの初期プロモーターにより説明されたダヒドロ麻酸レダクターゼ(DH-R) cDNAの細胞培養物における選択を可能にすることが含まれる。DH-R cDNAは、競争的阻害剤メトトレキセート(TM)に対する親和力1270-倍度の酵素の突起蛋白質をコードする(Simone et al., C. C. and Levinson, A. D. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 2493-2498)。これは、トランスフェクションされた細胞を細胞内濃度(0.5mM)のTM中で選択選択することを可能にし、DH-Rの不足した受容性細胞系の必要性を示す。

発現ベクターpNUT-TF/TD/2Nの構築のために、バクテリア発現ベクターからBamHI-HindIII「フラグメントを形成した(図1)。最初のトランスフェリンcDNAクローンからのBamHI-HindIIIフラグメントを単離した(図1)。その後これらの2つのフラグメントを、XbaI及びHindIIIを用いて切断したM1S内切及び複数形態DNAs中に複合した。得られた約3.9kDaからの複数形態DNAsを検出し、XbaI及びHindIIIを用いて切断することにより插入部を抽出させ、末端を平滑末端とした。これらの段階は、フラグメントが翻訳停止シグナルを含み、タンパク質のための天然のシグナル配列を保持し、最初のベクターにあるAGAAC配列を含まないことを確認する(図1)。このフラグメントをSmaIで切断しN末端に挿入し、かくしてヒト成長ホルモン遺伝子はTF/2NコードcDNAと置換されるが成長ホルモン遺伝子からの翻訳停止シグナルはそのまま残った。このプラスミドをBHK細胞中にトラン

ススクションし、得られた形質転換物をMTXの存在下で選択した。トランスフェクションされたBHK細胞により製造された同cDNA転写物の分析のために、カルムアルデヒドの存在下のアガロースゲル上で全RNAを電気泳動させた(Mantasic, T. et al. (1982) *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)。ニトロセルロース上に移した後、ハイブリッド形成プローブとしても用い得た子孫細胞後継に対するオリゴヌクレオチドを用いてプロットを分析した。トランスフェクションされた細胞系で約1.4kDaの標準mRNAが検出されたが、選択一感染BHK細胞では検出されなかった(データは示していない)。これ3.9kDaの非翻訳配列及びボリ(C)尾部を含むTF/TD/2Nの分子量と一致した。

形質転換されたBHK細胞により製造されたボリペプチドの分析のために、種々の細胞系の細胞タイプ及び培養の両方にわたるウェスターングロット分析を行った(図2)。自家BHK細胞、BHK-TF/TD/2N-プラスミドを含むBHK細胞及びTF/TD/2N-pNUTプラスミドを含むBHK細胞の試料をDMEM(BHK細胞)又はDulbecco-MTX(pNUTベクターを含むBHK細胞)中で培養した。細胞が増殖に適した培地の試料を採取し、細胞ライセートを調製した。これらの試料を適切な抗-TF抗原清反応ホモヤリン-固定S-アラレウス(S. araneus)細胞と共にインキュベートした(Yan, O. et al., B. A. et al. (1986) *Biochem. Cell Biol.* 64: 699-706)。

特表平7-502723 (8)

NaD_{2}O と SO_4^{2-} と共にインキュベートし、ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動させ、エトロセルロース膜に移すことにより結合タンパク質を分離した。その後蛋白セラジン抗ヒトTF抗体溶液及びアルカリホスファターゼと複合化したウサギ抗ヒツジ免疫グロブリンと共にインキュベートした。ヒト白細胞からの細胞ライセート又は培地(図2、1列及び2列)、あるいは $\text{LGH}-\text{D}\text{N}\text{R}$ マクロスミドを含むヒト白細胞からの細胞ライセート又は培地(図2、2列及び3列)を分析すると、最初のヒツジ抗体ヒトTF抗体から析出されるヒツジ免疫グロブリンバンド(Mr = 26,000及び30,000)及び少量の交叉免疫物質の峰が観察された。しかしヒトTF/2N- pNUC マクロスミドを含むヒト白細胞の細胞ライセート(図2、3a列)又は培地(図2、3b列)中に、さらにMr = 37,000のバンドが観察された。この示りべブチF端の分子量は、アミノ酸配列から算出されたヒトTF/2N分子の分子量(37,838)と非常に一致している。

ヒトTF/2N生成物の等質性は、SDS-PAGE上で細胞ライセート及び分泌蛋白質が共移動した際のシグナル配列の除去の成功を示す。沈澱物中にウシTFがほとんど現れないで統一血清はヒトTF特に特異性が高いことがわかる。

回転鏡で成像されるヒトTF/2N粗縫系の大環状構造の場合、培地中のヒトTF/2Nの濃度はラジオイムアッセイにより検出して約10-15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。

組み替えたTF/2Nの調製及び特徴化　組み替えたTF/2Nを3段階法により精製し、それはラジオイムアッセイに基づいて30%の收率の主要形態のタンパク質を目的的に与える。Polyacrylation

S上での最終的精製は、ウレア-PAGE(図3、パネルC)により確認される通り、タンパク質の非主要成分(<Mr 36)及び主要成分(図3、パネルA)の双方のアボー及びホーリー形態を定量的に分離した。ウレア-PAGE上で最も移動の遅いバンドはアボーハリヤ/2Nであり、移動の速いバンドはヒトTF/2Nであることは注意してほしい。SDS-PAGE上(図3、パネルB)は、ホーリー形態及び非主要形態の組み替えたTF/2Nが、等分子量の単分散であり、主要成分がPAS染色により脱水化合物を含まない(データは示していない)ことを示した。

一般にこれらの試料は、原成的接着ヒトTF/2Nより優れた単分散性を有するようである(Shineback-Zins, J. and Brew, K. (1980) *J. Biol. Chem.* 255: 708-713)(図3)。例えばカラムクロマトグラフィーのピークは前者の場合の方がより鋭利的であり、ウレア-PAGE上のバンドの数は後者の方が多い。統一純和組み替えたタンパク質の場合のスペクトル比は、典型的に $A_{280}/A_{260} = 2.1$ 及び $A_{280}/A_{240} = 1.38$ であり、これにヒト血清から単離された純粋なトランスフェリン二段の場合に復るとも劣らない。Fe(NTA)₂を用いたアボーダンパク質の3.68 A_{280} 単位の強度は、 $E_{280, \text{M}} = 2.1$ に対応する傾斜を与える。アボーダンパク質の $E_{280, \text{M}} = 3.8$ を示す(図4)。両方共、第一トランスフェリン分子として合理的な値である(Shineback-Zins, J. and Brew, K. (1980) *J. Biol. Chem.* 255: 708-713; Zek, G. et al. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 742: 490-495)。アボー及びPfeifer

TF/2Nの場合の β はそれぞれ6.5及び8.4であった。

非主要及び主要形態の双方の組み替えたTF/2Nのアミノ酸配列分析は、前述からのヒト-ヒトTFの場合に見いだされた結果と同一の結果を与えた(McGillivray, R. T. A. et al. (1980) *J. Biol. Chem.* 255: 8548-8553)(表2)。

組み替えたタンパク質のプロトンNMRスペクトル(図5)は、タンパク質分解-誘導ヒトTF/2Nのスペクトルと非常に似ている(Vaicek, A. A. and Woodward, R. C. (1987) *Biochemistry* 26: 3120-3125)が、組み替えたタンパク質の場合は方が共振線は鋭い。ヒトトランスフェリンを抽出した培地上で成形した硝酸銀板から精製したタンパク質の¹⁵N-NMRスペクトル(図6)は、4つの十分に分離した峰を示し、2つはおもく未分離ショルダーを有する。

■1

ヒトトランスフェリン及び組み替えたトランスフェリンアミノ酸第一分子のアミノ酸末端配列

タンパク質	アミノ酸配列	参考
ヒト血清	V-P-D-K-T-G-R-E-C-H-S-	McGillivray
トランスフェリン		et al. (1980)
組み替え	V-P-D-K-T-G-R-E-C-H-S-	本報告

HTF/2N(主観)

組み替え　アボーハリヤー　本報告
HTF/2N(非主要)

*組み替えたTF/2N記号は、Applied Biosystems社の470A テンパク質シーケンサー上で決定した。約200 μmol の各試料を分析した。*12シーケンサーサイクルを分析した。*サイクルまで残基は同定されなかった；しかし分析の前にシステイン残基は修飾しなかった。*6シーケンサーサイクルを分析した。

組み替えたTF/2N法を用いることにより、いくつかの仮定した基礎で侧面してタンパク質分解により得られた種と同一の構造を有するHTF/2N分子を製造する。これは、この重要な輸送タンパク質の機能的活性形態の、安定な粗縫系における発現の初めての報告となる。

本文に記載の粗縫系で得つくHTF/2N構造により、ロバーツ-不足酵素又は冗長な剪断増幅法を必要とせずに多量の組み替えたタンパク質が製造された。BHK細胞は経済的大量増殖に十分適しており、現在我々はバイオリソース容器中の導葉担体上での成形特性を試験中である。数リットルの容量を有する包被瓶又は发酵器のいずれかを用いることにより、従来新規のタンパク質を必要としてきたNMR法のような方法にさえ十分な組み替えたタンパク質を容易に製造することができる。

Polyacrylation S上での精製された赤主要形態の組み替えたTF/2Nは、ウレア-PAGE上の移動が主要形態より遅い(図3、パネルC)が、SDS-PAGE(図3、パネルB)上では同速度である。逆に見掛けの分子量は同じであるがらMウレア中の変性の標的的程度が異なる。タンパク質分解-誘導アボーハリヤー/2NはMウレア中で

特表平7-502723 (9)

も移動の速い側を取ることに留意してほしい(図3、パネルC、部分D及びE)。

これらのゲル上のアーチ TTF/2Nによるアーチ TTF/2Nの汚染及びその他の、PP-LC部分の板塊液、フレアゲルの上における結合膜のいくらかの損失、及びPP-LC試料の吐上げの際の汚染物の結合から生ずる。同一のN-末端配列(表1)は、シグナルペプチドが本主要及び主要形態の組み替えタンパク質の両方から除去されたことを示す。ヒト血清からのヒトT/2Nの場合と同様に(Shineback-Zimmet, J. and Brew, K. (1980) *J. Biol. Chem.*, 255: 708-713)、組み替えヒトT/2Nはヒドロキシ化である。ヒトT/2Nの主要形態及び非主要形態の差の理由は現在未知である。养生型形態は合計の組み替えタンパク質の5%以上となりず、通常1%以下である。従って半分組み替えヒトT/2N(主要形態)の相應の目標は達成された。

組み替えヒトT/2Nの鉄結合基點、pI-NaDodSO₄-PAPG及びウレア-PAGE上の移動、ならびにプロトンNMRスペクトルは、ナーキシシンを用いたタンパク質分解によるアミノ酸残りTTF-ペプチドから結果を得たヒトT/2Nのものと、上記の点を除いて十分合致的に一致する(Shineback-Zimmet, J. and Brew, K. (1980) *J. Biol. Chem.*, 255: 708-713; Vacone, A. A. and Woodward, R. C. (1987) *Biochemistry*, 26: 8120-3126)。タンパク質分解により精製されたヒトT/2Nより主要形態の組み替えタンパク質は準分数倍が高く(図3)、そのプロトンNMRスペクトルは統一的の特性として用いた(図2)。PCRグライマーとして用いるために2種のオリゴヌクレオチドを合成した。オリゴ上は、Sma I切開部位をコードし、5'下の天然のシグナル配列をコードする配列が統一し、アミノ酸334-341のコード配列と合わさる配列が統一した。第2のオリゴヌクレオチドはヒトT/cDNAの5' 非翻訳領域の組合体と合わせり、正常な翻訳停止部位にSma I認識配列3'を導入する。(Vacaone, A. A. et al. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 2752-2756による番号付けを用いてヌクレオチド2125-2127)。Tagポリメラーゼ(Perkin Elmer Biomer)を用いた25回のPCR増幅は、所望のDNAsフラグメントを毎回、それはヒトTの天然のシグナル配列をC端部コード配列にスプライシングする。このフラグメントをその後Sma Iで消化し、ヒトT/2N発現研究の場合と同じにNUTの大Sma Iフラグメントを測定した。

1.1.1. 組み替え全長トランスフェリンの製造

ヒト血清トランスフェリンのためのコード配列を、上記のヒト前導ペイプラリから導出した全長ヒトDNAsクリーンから説明した割離酵素消化フラグメントから導き立てた。最初のクローンの終となるプラスミド(pKST-218)のエニーグ制限酵素認識部位の数が限られていたので、細胞内ベクター中にコード配列を導入するための一連のクローニング段階が必要であった。この過程は、cDNAの5'末端からのHind III/Bam HIフラグメントのベクターpVC18へのクローニングにより開始された(Messing, J. (1983) *Methyl. E. coli* 1, 101: 20-28)。導入されたプラスミドをBam HI

特異標を示す。非主要形態の量はNMRによる分析には不十分であった。

S. col Iからアルカリホスファターゼ中のm-フルオロチロシンの挿入の以前の研究は、タンパク質中のチロシン残基を特異的に検査するための¹⁴F-NMRの有効性を確立した(Sarkar, B. D., et al. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71: 469-473; Hull, W. G. and Sykora, B. D. (1974) *Biochemistry*, 13: 3431-3437)。組み替えヒトT/2N中へのヒートアーチオランジンの挿入により、この細胞培養液において選択的アミノ酸残基が同様であり、チロシン側鎖の結果約NMRプローブへの効果を与えることが証明された。この結果はヒートアーチオランジンを用いて上記で記載した通り、ヒートアーチオランジンをすべての点で同様に操作する。多量の挿入の達成のために四重培養条件を最適化した場合、希釈性及び医療性金属を添加した時、及びpHを変化させた時の¹⁴F-NMRスペクトルの変化は、金属結合に特異的に含まれるチロシン側鎖の研究に有用であろう。選択的ジオーテリックム化した弊害族アミノ酸の挿入は、日本ウズラからのリゾチームに関する研究と同様の方法でタンパク質のプロトンNMRスペクトルの芳香族側鎖の分析を可能にするであろう(Brown-Maddock, A. et al. (1981) *J. Biol. Chem.*, 256: 1506-1509)。

1.1. カルボキシ末端突出部を含む組み替えトランスフェリン半分子の製造

ヒトTのカルボキシ末端部のコード配列を含むヒトT制限フラグメントを、全長ヒトT/cDNAから取離し、PCR-指示突然変異法

1及びHind IIIで消化し、ヒトトランスフェリンとcDNAからのBam HI/Hind IIIフラグメントを最初のフラグメントに接続してクローニングした。得られたプラスミドをその後Hind III及びPst Iで消化し、トランスフェリン cDNAの3'末端からの最終的Hind III/Pst I フラグメントをクローニングし、全長コード配列の組み立てを完了した。N-及びC-末端トランスフェリン半分子コード配列の場合に記載した通り、得られたプラスミドをSac I及びSph Iで消化すると、1組の制限フラグメントとして全長コード配列を放出し、残いてモラミンTとcDNAオリゴマー及びdTTPを用いて修飾化し、その後NUTの大Sma Iフラグメントにクローニングした(Palmiter, R. et al. (1987) *Cell*, 50: 435-448)。

プラスミドDNAはE. coli L JM109から取離し、液体サシウム勾配を用いた2道純度段階により精製した。ベビーハムスター腎臓(ウサギ)細胞を、10%の牛胎児血清を含むDMEM(10% FBS)及びPen-Strep-Ham's + F-12栄養剤混合物(DMEM/F-12)(Gibco; Sigma)中で100 mmの相当たり約1.0 g細胞に底面し、残いでSeaplate, P. F. et al. (1985) *MoL Cell Biol*, 5: 1480-1489に記載のリン酸カルシウム共沈法により10 µgのプラスミドを用いてトランスフェクションした。24時間後、培養を500 µg/mlのメトトレキサート(MTX)を含むDMEM-F-12に変え、プラスミド含存細胞を選択した。選択したら、GDTA(0.2 g/ml)を含むリン酸塩緩衝液水を用い、細胞を約3日後の密度は約5個/1.0 mm²に

特許平7-502723 (10)

置換突然変異体を指定する。例えば位置 8-3 のアスパラギン酸残基がセリシン残基により置換された変異体は、D 6-3-S と指定される。

ヒト F / 2 N 变異体の製造は、2通りの方法で行った。D 8-1-S 互換体は、Nelson, R. M. and Sheng, G. L. (1989) *Analyst. Biochem.* 180: 147-151 の方法を用いて製造した。簡単に述べると、ヒト F / 2 N コード配列の 5' 末端からの H p A + T + B + m H T フラグメントを pGK18 中にサブクローニングし、その後 PCR に既存の 2 種類突然変異体発現法の転型として使用した。得られた DNA フラグメントをその後 M 13 mp 18 中に再クローニングし、突然変異体構造物の配列をシテオキシ配列分析により確認した。その後フラグメントを、Xba I 及び Sac I で消化することにより 2 本鎖形態の配列決定ベクターから放出し、最初のヒト F / 2 N 構造物からの 5' 末端 / 特異性 + 1 フラグメントを連結して全長 D 8-1-S + hTF / 2 N コード配列を製取し、このスプライシングの忠実度を射線暗化分析により確認し、その後前と同様に pGK18 中にクローニングした。

ヒト F / 2 N コード配列を M 13 mp 18 にサブクローニングし、その後それをオリゴスクレオチド一端示突然変異体 (Zoeller, M. J. and Smith, M. (1988) *Meth. Enzym.* 161, 100: 458-600) の転型として用い、Sph I, Kpn I, Sac I, Sal I, Sca I, U3A, S2: 468-492 を用いることにより、置換突然変異体 D 6-3-R, D 6-3-C, K 2-0-Q 及び K 2-0-T を製造した。突然変異体の後、突然変異体配列のための全コード配列を、2

その後 3 回の T - 175 プラスコに、最後に 5 倍の酵素濃度回収液 (それぞれ 2.00 ml) に追加に添加させた。T - 175 通過の際に、フェノール赤を含まない DEAE-M - P - 12 中のウシ胎児血清の代わりに酢酸鈉、U 1 trisler (Gibco) を 1% の量で用いた。

一度生産量が高くなると (約 10.0 mg/m² 培地)、U 1 trisler + G を含まない培地が少なくとも 2 回通過の間、組み替えたタンパク質の製造を維持できることが見いだされた。これは発現された全ヘモグロビンヒト胎児トランスクルタミンの鉄離を非常に簡略化した。組み替えたタンパク質の精製のために、収穫した培養培地をフェニルメタンスルホニルフルオリド及びナトリウムアソドに加えて、0.1% とし、それをプロテアーゼ及びペクタリニア成長を除去する。溶解するトランスクルタミンの初期に十分な DTT (ニトリセトリ醇酸) + を加える。培地の体積を < 1.0 ml に減少させ、組み替えたヘモグロビンヒト胎児トランスクルタミン第一分子に関して配載したアニオン交換カラム (P-1 カラム 0.4, 1 × 1.0 cm) 上を通過させることにより精製する。上記参照。

精製された組み替えた全ヘモグロビンヒト胎児トランスクルタミンはこのカラム上で、グリコシル化パターンの変動によるいくらかの異質性を示す。タンパク質は Na-Dodecylsulfate-ボリアクリルアミドゲル電気泳動に加えて单分散であり、精製ヒト胎児トランスクルタミンと同様のスペクトル及びスペクトル比を有する。

IV 突然変異体トランスクルタミンの製造

野出型 (本来) の精基の従来の崩れ文字アミニノ酸記号、それに続いで一次配列中の置換の数値記号、(この場合改めタシバク質のパリンを位置 1 と対応する)、及びそれに続く置換残基の記号を用いることにより

5.0 bp 国際コード配列の長さに沿って標的該定した配列決定プライマーを用いたシテオキシ配列分析により確認した。その後合成のコード配列を、利尿消化により放出し、平滑化し、前記の通り NUT 中に挿入した。

a) 全ヘモグロビンヒト胎児トランスクルタミン (hTF) 及び b) アミノ酸側半分子 (hTF / 2 N) の種々の特定位の突然変異体のための c) DNA を含む pNUF プラスミドが構築された。これらの突然変異体は、1) ヒトメラノフェリントンの C - 末端半分に見られる天然に起こる突然変異に基づくものと、2) 英国の患者からの hTF の C - 末端半分に見られる天然に起こる突然変異に基づく Q 65 R、c) ニフトリの卵巣からのオボトランスクルタミン (oTF) 中の C - 末端半分の野生型突然変異に基づく K 2-0-Q、d) ヒトラクトフェリントン (トライド) 中の野生型突然変異に基づく H 2-0-T 及び e) 錠結合部位の全導導活性を要する試みとしての D 6-3-S を含む。これらの導導物はすべてペピースター腎臓細胞の変形性導導物中、1.0 - 1.0 mg の組み替えたタンパク質の量で発現された。さらに oTF のための全長 cDNA 及び hTF / 2 N - oTF / 2 N ならびに oTF / 2 N - hTF / 2 N のためのキメラ cDNA を含む NUT プラスミドが構築された。

特定位の突然変異体の特性には、D 6-3-S 突然変異体は鉄と結合するが (文献中の相違に反して) 野生型タンパク質よりずっと弱いかであることが含まれる。例えはこの突然変異体は、各 M-ウレアを含む SDS-PAGE における精製活動にてその結合力を失うが、野生型はその結合能を保持している。可視スペクトルの最大は 422 nm にあり、野生型の 470 nm と対照的である。Q 65 R 及び突然変異体は、野生型より鉄との

結合が強く、470 nm に可視スペクトルの最大を有する。K 2-0-Q 突然変異体は、そのモデルである oTF / 2 N と同様に野出型よりずっと強しく鉄と結合する。野生型鉄タンパク質の赤色は、それぞれ 1 mM の EDTA 及び NTA を含む 0.5 M 酸酵母細胞液、pH 4. 8 中で非常に急速に消えるが、突然変異体は全く色を失わず、その結合能を検出するためには pH 4 及び 1 mM のダブルオキサミンが必要である。アボット突然変異体は、鉄との而結合が野生型タンパク質より遅いようである。c) の突然変異体の場合の可視スペクトルの最大は 460 nm にある。

全長組み替えた hTF は、カルボ - PEG 上で前清 - 脱媒タンパク質と同速度で移動する。

回復期

当成技術における挑戦者は、本文に記載の特定の方針に関する多数の同様物を日常的実験のみを用いて認識する、又は確かめることができるであろう。そのような同様物は本発明の範囲内であり、以下の請求の範囲に含まれると考えられる。

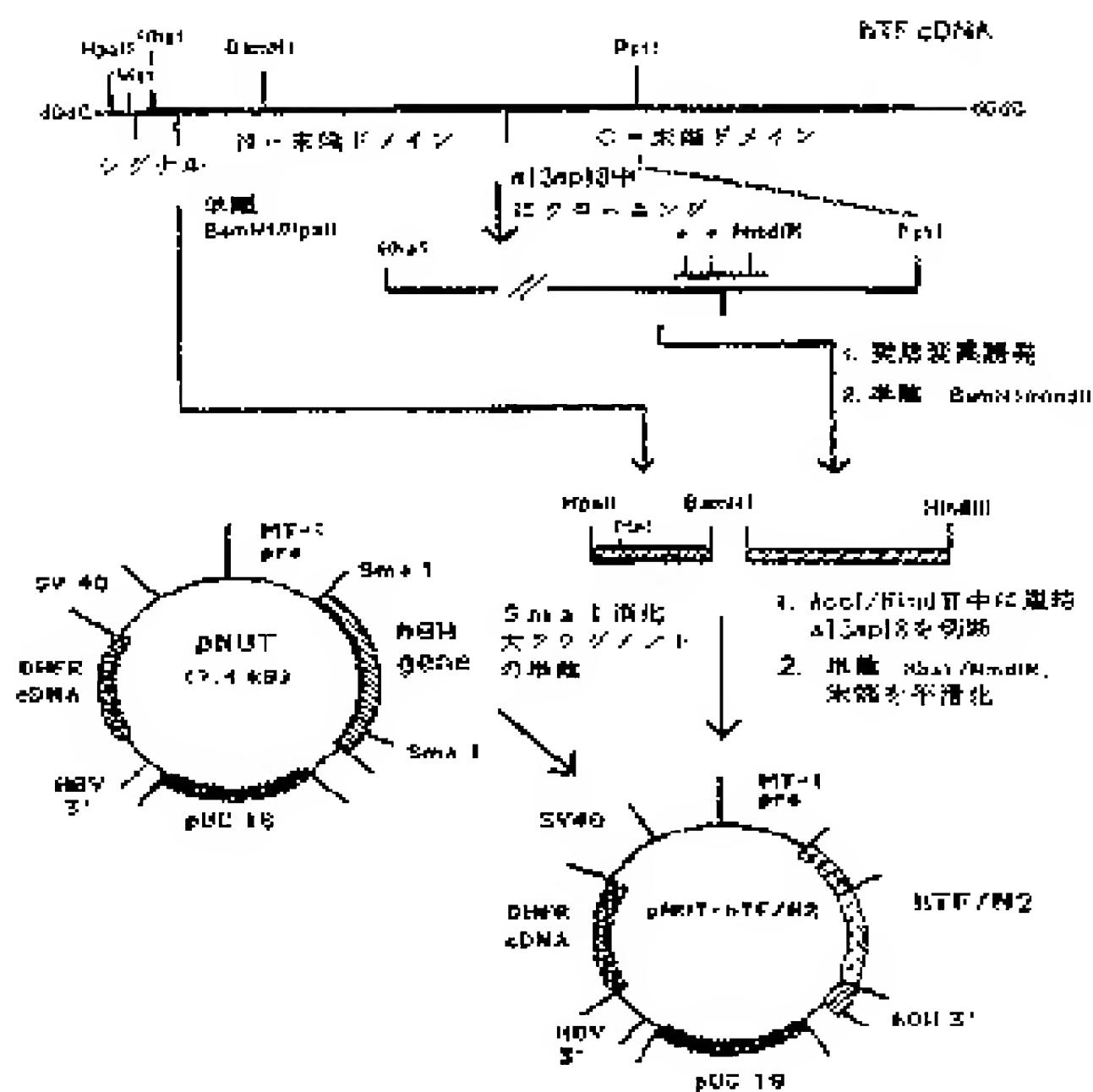


FIG. 1

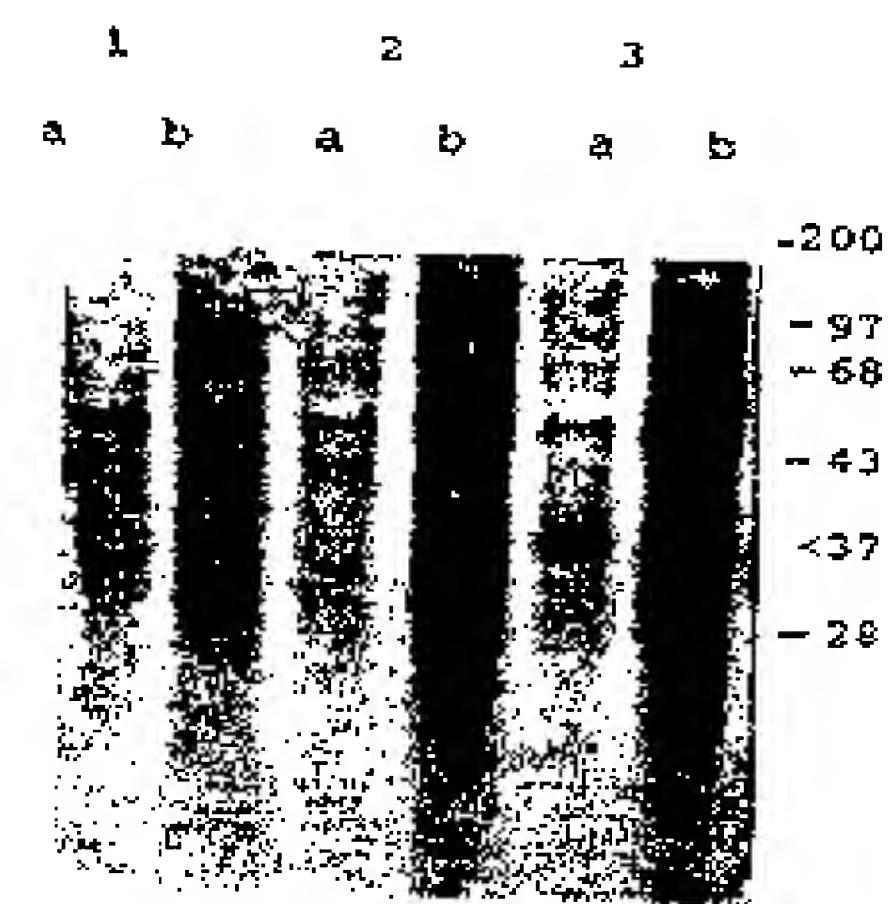


FIG. 2

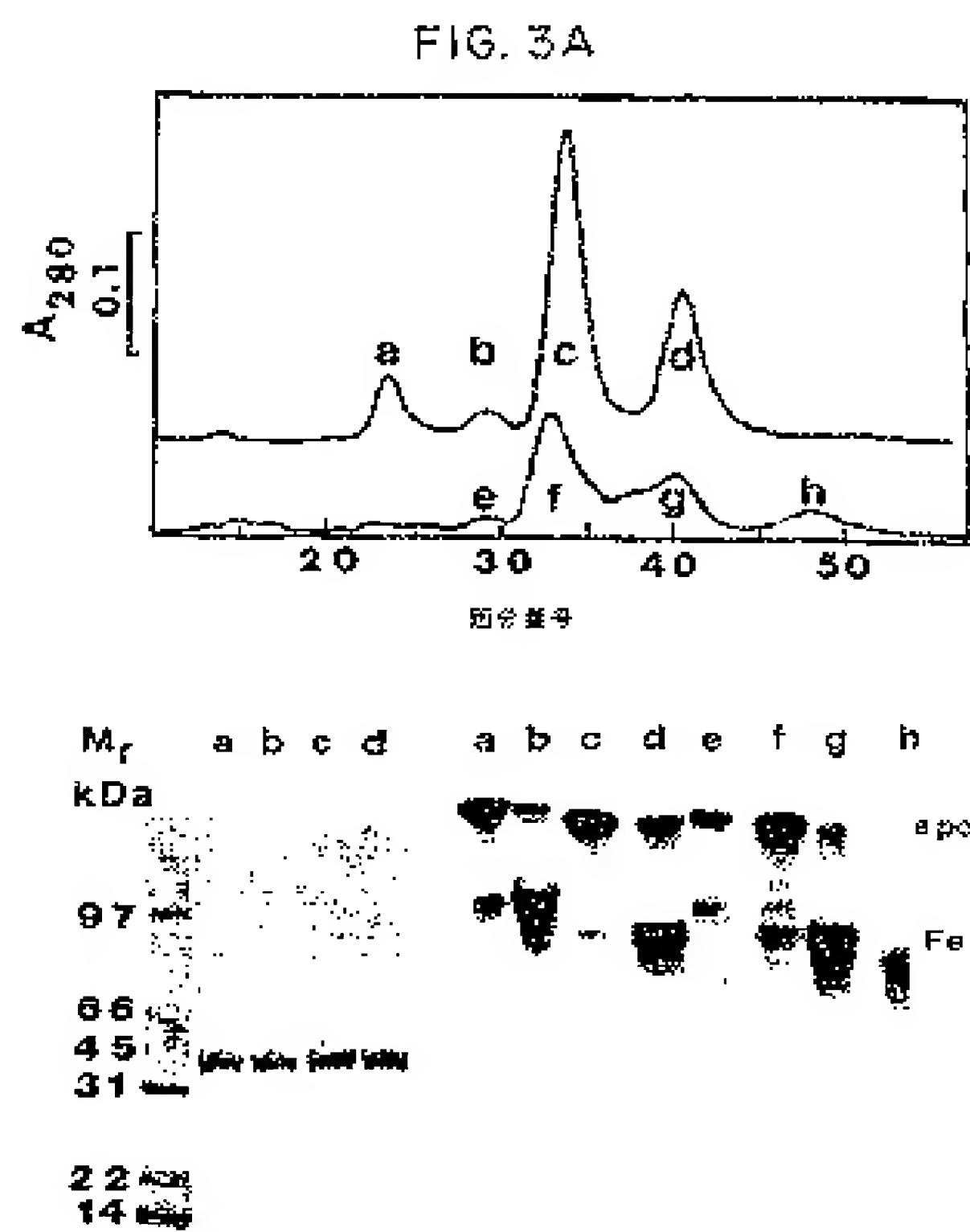


FIG. 3A

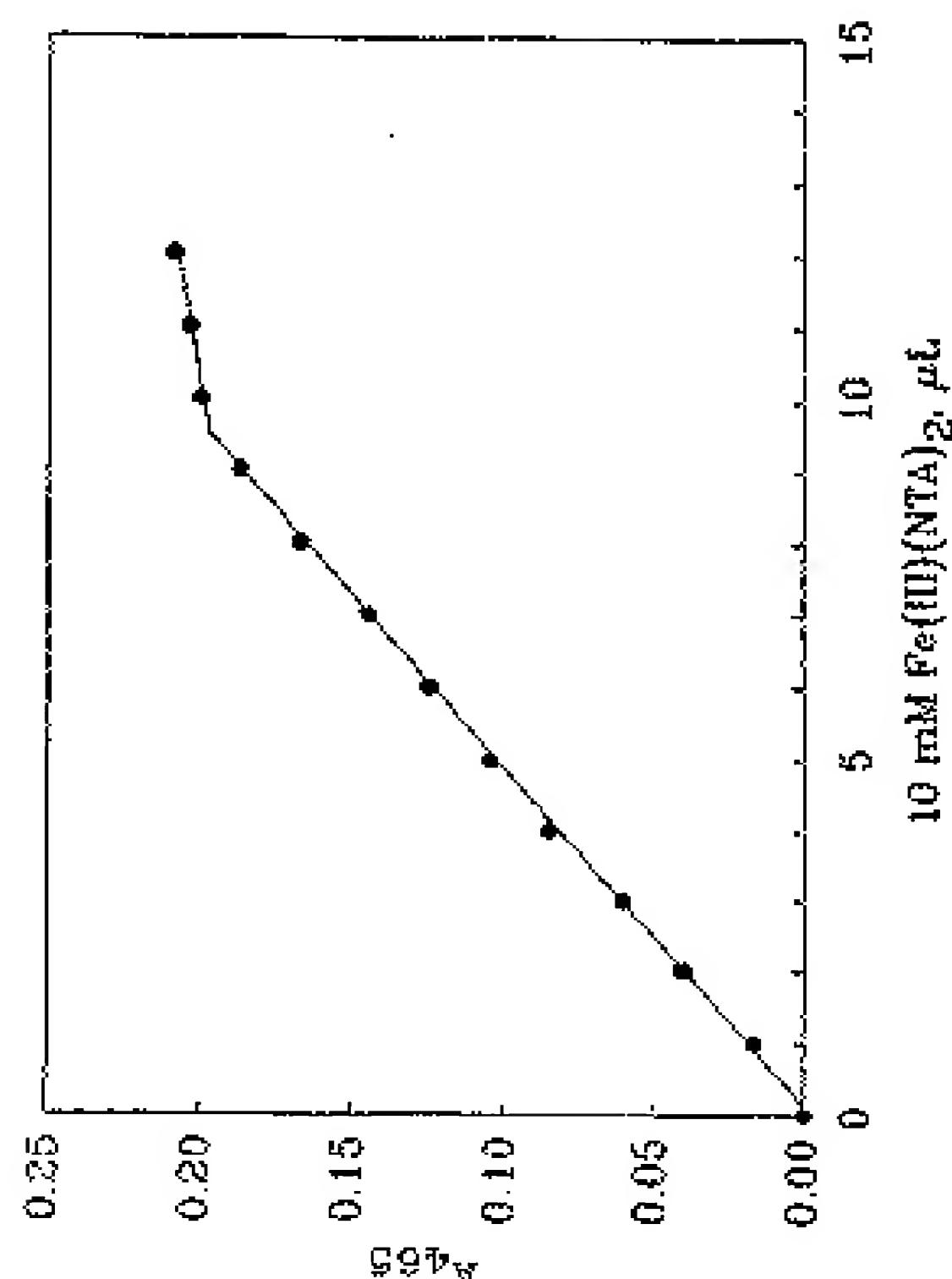
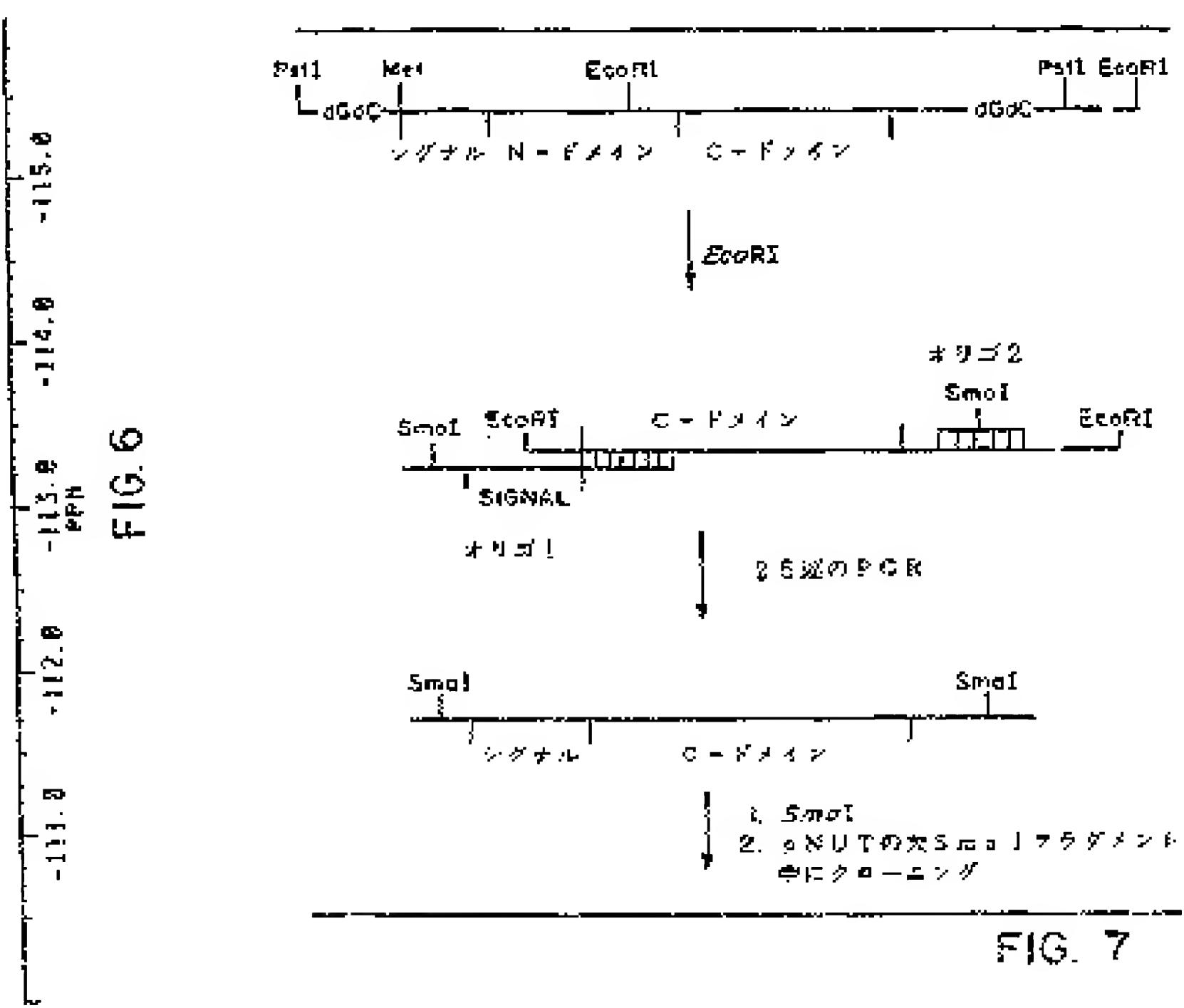
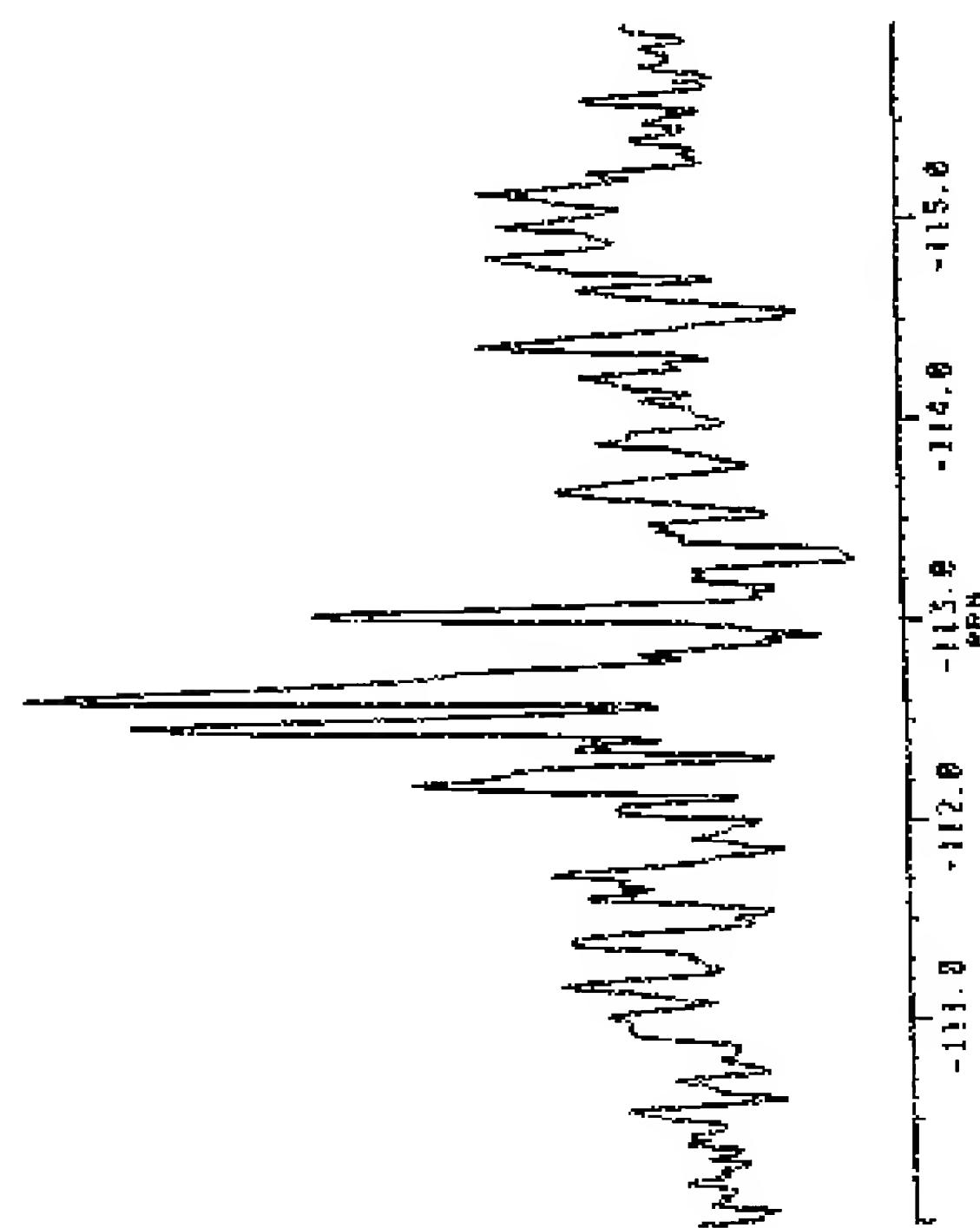
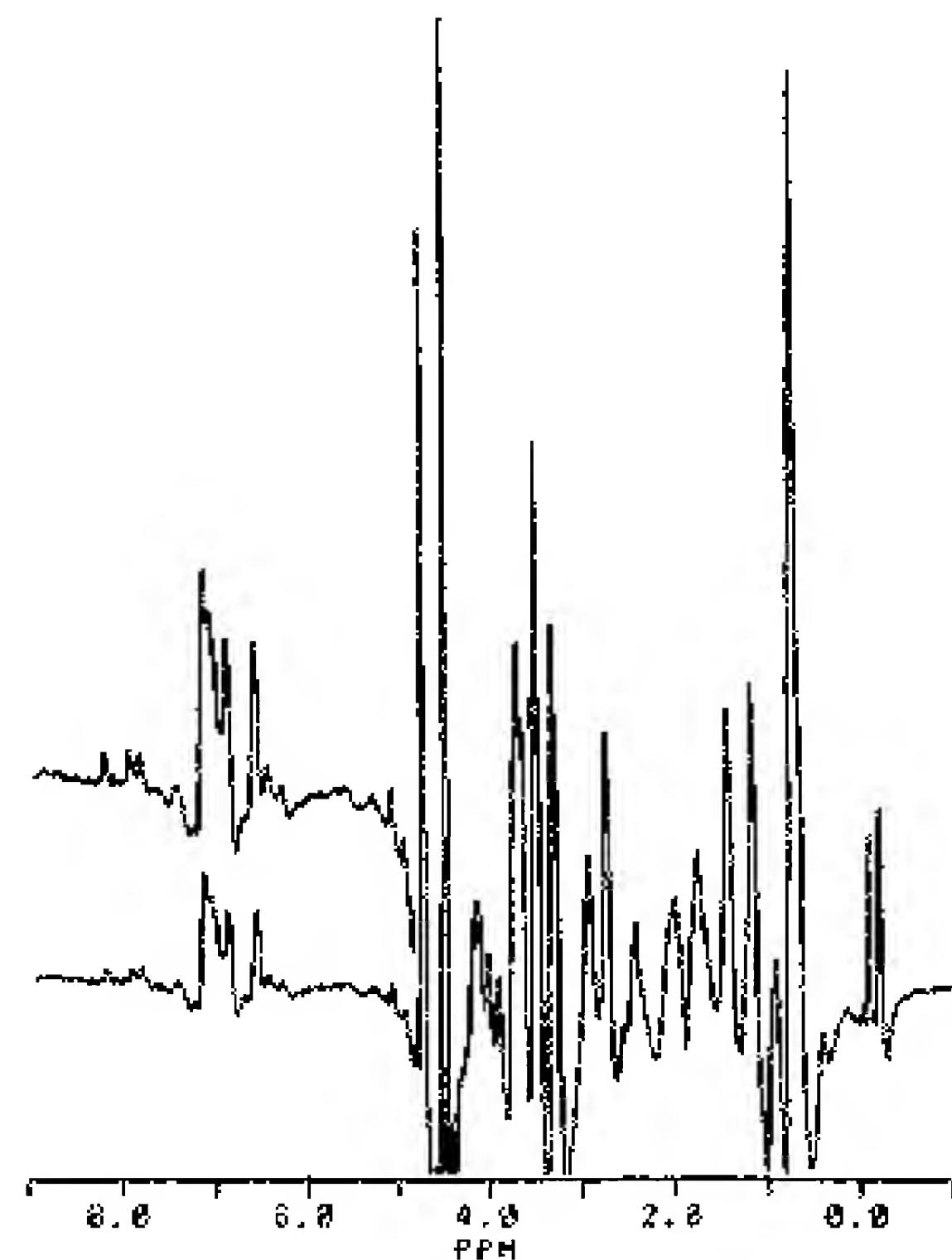
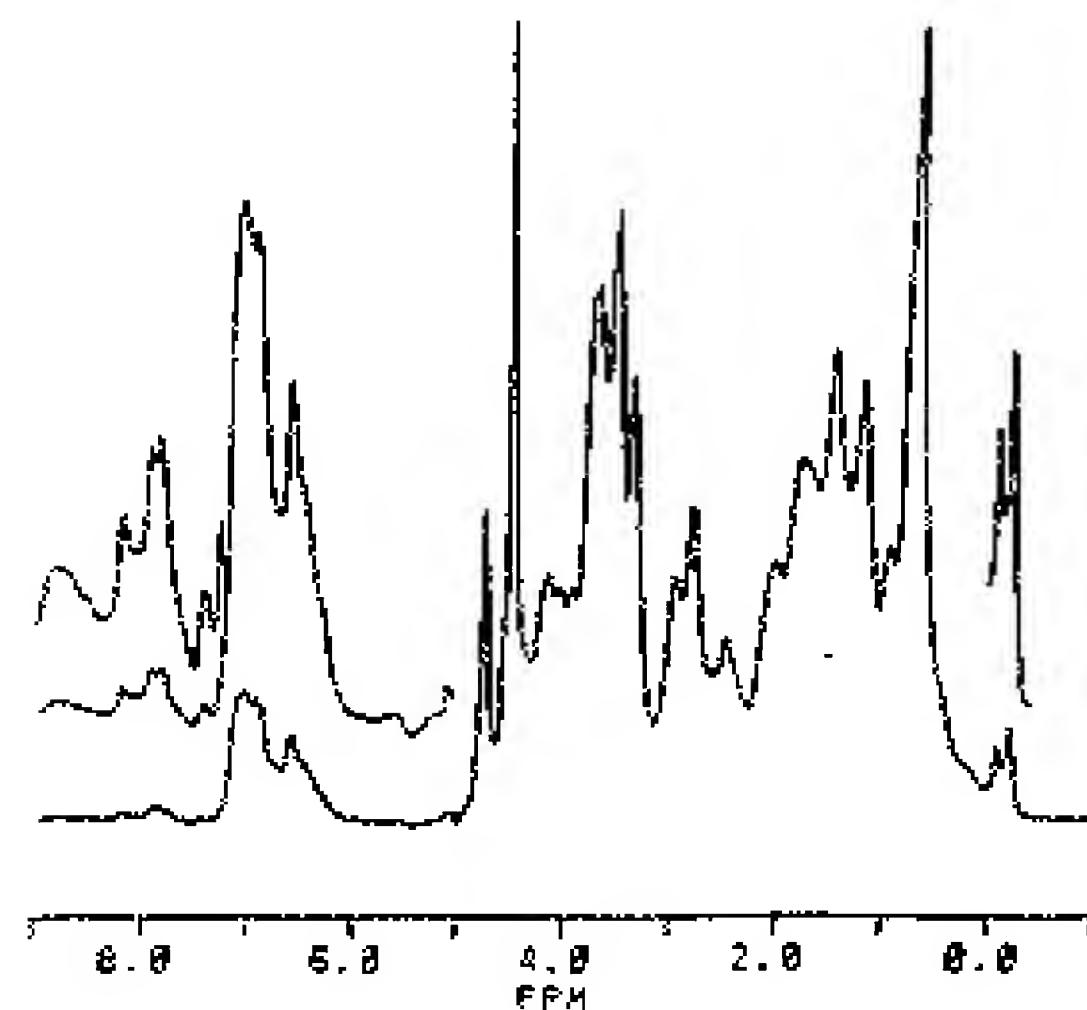


FIG. 4



請求の範囲

補正書の写し(翻訳文) 発明者 (特許法第184条の2)

平成5年8月6日 [記]

特許庁長官 麻生 波照

1. 特許出願の要旨

PCT/US92/00928

2. 発明の名称

網状構造トランスフェリン、トランスフェリン半分子、及びそれらの突然変異体

3. 特許出願人

住所 アメリカ合衆国バーキントン州05405バーリントン
(在地なし)

名 称 ザ・ユニバーシティ・オブ・バーモント・アンド・スティート・アグリカルチュラル・カレッジ (ほか1名)

4. 代理人

住所 東京都港区赤坂1丁目9番15号
日本自動車会館
氏名 (6078)井垣士 小林義平吉
電話 3583-2256

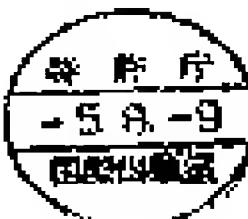
5. 補正書の提出年月日

1993年5月4日

6. 審査請求の旨

(1) 補正書の写し(翻訳文)

1送



治療的組成物。

9. 他の哺乳類タンパク質を含まない機能的活性哺乳類トランスフェリンの基本的に特質な製造物。

10. 他のヒト血清タンパク質を含まない様式結合ヒト血清トランスフェリンの基本的に特質な製造物。

11. a) トランスフェリンをコードするDNAmを含む発現ベクターを用いてトランスフェクションされた真核細胞を、トランスフェリンを発現させる条件下で培養し、

b) 発現されたトランスフェリンを回収する段階を含む、複数の活性哺乳類トランスフェリンの製造法。

12. ベクターがプラスミド型リソームである、請求の範囲11に記載の方法。

13. 真核細胞がベビーハムスター腎臓細胞である、請求の範囲11に記載の方法。

14. a) トランスフェリンの接着可能プロモーターに作動的に結合した、トランスフェリン及びその一部をコードするDNAmを含む発現ベクターを用いてトランスフェクションされた真核細胞を培養し、

b) プロモーターを読み取ってトランスフェリンの発現を誘導し、

c) 発現されたトランスフェリンを回収する段階を含む、複数の活性哺乳類トランスフェリンの製造法。

15. プロモーターが強烈非可逆メタロチオネインプロモーターである、請求の範囲14に記載の方法。

16. a) 請求の範囲12に記載の発現ベクターを用いてトランスフェクションされた真核細胞をトランスフェリン半分子を発現させる条件下で培養

1. 哺乳類トランスフェリンのアミノ末端を含む突端部とは別に基本的に哺乳類トランスフェリンのカルボキシル末端を含む突出部を含む、複数的活性トランスフェリン半分子。

2. 少なくともトランスフェリンの1端の突出部の金属-結合ドメインを含み、他の突出部の金属-結合ドメインを含まず、突端変異体が金属に対して天然の哺乳類トランスフェリンの結合力より強い結合力を有する、複数的活性突然変異体哺乳類トランスフェリン半分子。

3. 既に対しても天然の哺乳類トランスフェリンより強い結合力を有する、請求の範囲2に記載の突然変異体トランスフェリン半分子。

4. 少なくともトランスフェリンの1端の突出部の金属-結合ドメインを含み、天然の哺乳類トランスフェリンの位置206のリシン残基がグルタミンにより置換されている、請求の範囲3に記載の突然変異体トランスフェリン半分子。

5. 少なくとも哺乳類トランスフェリンのカルボキシル末端を含むトランスフェリンの1端の突出部の金属-結合ドメインを含み、他の突出部の金属-結合ドメインを含むない哺乳類トランスフェリンの複数的活性半分子を金属の荷電量を等価量以下に下げるのに十分な量で含む、金属キレート化合物で用いるための治療的組成物。

6. 金属が銅である、請求の範囲5に記載の治療的組成物。

7. トランスフェリン半分子が天然のトランスフェリンより強く金属に結合する突然変異体である、請求の範囲6に記載の治療的組成物。

8. トランスフェリン半分子が天然のトランスフェリンのリシン残基の代わりに位置206にグルタミン残基を含む、請求の範囲7に記載の

し、

b) 発現されたトランスフェリンを回収することにより製造された、基本的に他の哺乳類タンパク質を含まない複数的活性哺乳類トランスフェリン。

國 無 聲 雜 誌

PRACTICE INFORMATION FORM - ADDITIONAL INFORMATION		
<p>IV. <input type="checkbox"/> INFORMATION WITH CERTAIN COUNTRIES WHERE TRADE UNPREDICTABLE?</p> <p>The information which appears has been obtained in respect of certain countries under Article 1(3) of the General Agreement.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Other countries, including those listed below, may be subject to an agreement by the Agreement, pursuant:</p> <p>1. <input type="checkbox"/> Other countries, including those listed below, which have not yet entered into an agreement with the General Agreement. The countries which are not yet party to an agreement are: Argentina, Brazil, Chile, Costa Rica, Ecuador, Mexico, Paraguay, Uruguay, Venezuela.</p> <p>2. <input type="checkbox"/> Other countries, including those countries which have entered into an agreement with the General Agreement, but not yet ratified it. The countries which have not yet ratified the General Agreement are: Bolivia, Colombia, Ecuador, El Salvador, Guatemala, Honduras, Peru, Uruguay.</p> <p>3. <input type="checkbox"/> Other countries, including those countries which have entered into an agreement with the General Agreement, but not yet ratified it. The countries which have not yet ratified the General Agreement are: Argentina, Brazil, Chile, Costa Rica, Ecuador, Mexico, Paraguay, Uruguay, Venezuela.</p> <p>4. <input checked="" type="checkbox"/> Other countries which have entered into an agreement with the General Agreement, but not yet ratified it. The countries which have not yet ratified the General Agreement are: Argentina, Brazil, Chile, Costa Rica, Ecuador, Mexico, Paraguay, Uruguay, Venezuela.</p> <p>Other countries which have entered into an agreement with the General Agreement are: Argentina, Brazil, Chile, Costa Rica, Ecuador, Mexico, Paraguay, Uruguay, Venezuela.</p> <p>PRACTICE INFORMATION FORM</p> <p>1. <input type="checkbox"/> In accordance with the General Agreement, the following countries have entered into an agreement with the General Agreement:</p> <p>Argentina, Brazil, Chile, Costa Rica, Ecuador, Mexico, Paraguay, Uruguay, Venezuela.</p> <p>2. <input type="checkbox"/> In accordance with the General Agreement, the following countries have entered into an agreement with the General Agreement, but not yet ratified it:</p> <p>Bolivia, Colombia, El Salvador, Guatemala, Honduras, Peru, Uruguay.</p> <p>3. <input checked="" type="checkbox"/> In accordance with the General Agreement, the following countries have entered into an agreement with the General Agreement, but not yet ratified it:</p> <p>Argentina, Brazil, Chile, Costa Rica, Ecuador, Mexico, Paraguay, Uruguay, Venezuela.</p> <p>4. <input type="checkbox"/> In accordance with the General Agreement, the following countries have entered into an agreement with the General Agreement, but not yet ratified it:</p> <p>Argentina, Brazil, Chile, Costa Rica, Ecuador, Mexico, Paraguay, Uruguay, Venezuela.</p> <p>5. <input type="checkbox"/> The following countries have not yet entered into an agreement with the General Agreement:</p> <p>Colombia, El Salvador, Guatemala, Honduras, Peru, Uruguay.</p>		

PURCHASE REQUEST FORM FOR THE CBER SPECIAL STOCKPILE

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁶	識別記号	序内整理番号	F I
C I 2 N 15/09	Z N A		
C I 2 P 21/02	Z N A C	9282-4B	
//(C I 2 N 15/09	Z N A		
C I 2 R 1:91)			
(C I 2 P 21/02			
C I 2 R 1:91)			
	8412 -4B	C I 2 N 5/00	B
		//(C I 2 N 15/09	Z N A A
		C I 2 R 1:91)	
(72) 発明者 フアンク、ウォルター・ディ	(72) 発明者 メイソン、アン・ビー		
アメリカ合衆国テキサス州75243ダラス・	アメリカ合衆国バーモント州05445シャー		
アパートメント2202・オードリアロード	ゼツチ・ノースグリーンブッシュロード		
11991	(番地なし)		
(72) 発明者 マツギリブレイ、ロス・ティ・エイ	(72) 発明者 ウッドワース、ロバート・シー		
カナダ国ブイ6ティ 1ティア・ブリティ	アメリカ合衆国バーモント州05482シエル		
ツシユコロンビア・バンクーバー・アリゾ	バーン・ローガンレイン4		
ンロード2233・アパートメント807			